

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-038297

(43)Date of publication of application : 19.02.1993

(51)Int.Cl.

C12Q 1/00
C12M 1/34
C12M 1/40
C12Q 1/42
G01N 21/64
G01N 33/535
G01N 33/543

(21)Application number : 03-146301

(71)Applicant : TOSOH CORP

(22)Date of filing : 18.06.1991

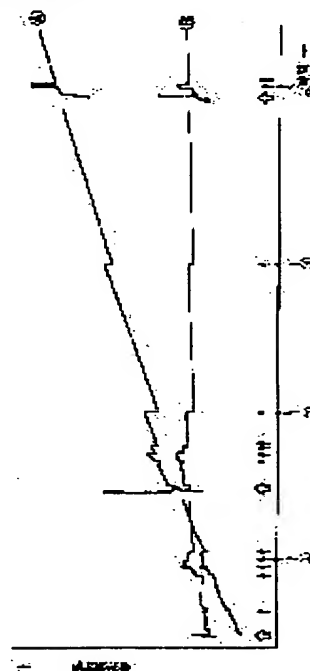
(72)Inventor : HAYASHI HIDECHIKA
UMEGAYA YOSHIHIKO
MITSUHISA YUKIO

(54) METHOD AND DEVICE FOR MEASURING ACTIVITY OF ENZYME

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable to precisely detect the activity of an enzyme bonded to a biological substance, etc., contained in a fine amount of a specimen without affected by air bubbles and meniscuses.

CONSTITUTION: The determination of a biological substance in a specimen is performed by adding a standard substance to the specimen, measuring the fluorescence strength of a substance changed by the action of the enzyme and measuring the fluorescence strength of the standard substance not changed by the action of the enzyme.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

24.02.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

2912957

[Date of registration]

16.04.1999

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-38297

(43)公開日 平成5年(1993)2月19日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/00		Z 6807-4B		
C 1 2 M 1/34		E 7229-4B		
1/40		B 2104-4B		
C 1 2 Q 1/42		6807-4B		
G 0 1 N 21/64		Z 9115-2J		

審査請求 未請求 請求項の数9(全18頁) 最終頁に続く

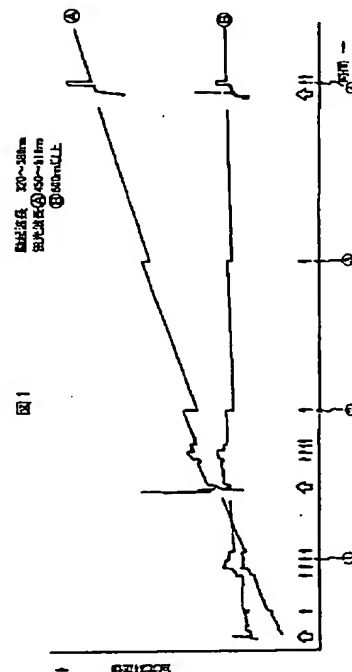
(21)出願番号	特願平3-146301	(71)出願人	000003300 東ソー株式会社 山口県新南陽市開成町4560番地
(22)出願日	平成3年(1991)6月18日	(72)発明者	林 秀知佳 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台1-19
		(72)発明者	梅香家 佳彦 神奈川県横浜市戸塚区戸塚町4501
		(72)発明者	光久 幸男 神奈川県海老名市河原口2398
		(74)代理人	弁理士 本多 小平 (外4名)

(54)【発明の名称】 酵素活性測定方法及び装置

(57)【要約】

【目的】 微量な試料中の生体物質等に結合した酵素の活性を、気泡やメニスカスの影響を受けずに精度よく検出できるようにする。

【構成】 試料の基準物質を混在させ、酵素の作用で変化する物質の蛍光強度を測定すると共に、酵素の作用を受けない基準物質の蛍光強度を測定して、これらの二つの蛍光強度から、試料中の生体物質の量を定量する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酵素と、この酵素の作用を受けて生成物を生ずる基質と、上記酵素の作用は受けないが蛍光は発する基準物質とを含んだ試料に、励起光を照射し、これによって該試料から放射される蛍光のうち、少なくとも上記生成物からの蛍光を含む波長の蛍光強度により第一の測定値を求めると共に、該第一の測定値を求めた波長とは異なりかつ少なくとも上記基準物質からの蛍光を含む波長の蛍光強度により第二の測定値を求め、これら第一の測定値と第二の測定値の比に基づき上記酵素の活性を求めることを特徴とする酵素活性測定方法。

【請求項 2】 請求項 1 において、基質及び生成物の双方が蛍光物質であることを特徴とする酵素活性測定方法。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 において、励起光を、基質と生成物のうち少なくとも一方と基準物質の双方を励起できる波長領域を含むように設定すると共に、第一の測定値は、基質あるいは生成物のいずれか一方又は双方から放射される蛍光の波長領域で測定し、第二の測定値は、基質及び生成物から放射される蛍光が実質的に含まれずに基準物質から放射される蛍光が殆どである波長領域で測定することを特徴とする酵素活性測定方法。

【請求項 4】 請求項 1 乃至 3 のいずれかにおいて、第一の測定値を第二の測定値で除算した値の経時的な変化率に基づいて酵素活性を求めることを特徴とする酵素活性測定方法。

【請求項 5】 請求項 1 乃至 4 のいずれかにおいて、酵素が酵素標識免疫測定方法において測定される対象であることを特徴とする酵素活性測定方法。

【請求項 6】 請求項 1 乃至 4 のいずれかにおいて、酵素が酵素標識 DNA ハイブリダイゼーション法において測定される対象であることを特徴とする酵素活性測定方法。

【請求項 7】 酵素の作用に由来して増加あるいは減少する蛍光物質及び酵素の作用を受けないが蛍光は発する基準物質を含む試料に対して励起光を照射する投光手段と、試料が放射する蛍光のなかから上記蛍光物質に由来した第一の測定値を求める波長の成分を取り出して蛍光強度を測定する第一の受光測定手段と、試料が放射する蛍光のなかから上記基準物質に由来した第二の測定値を求める波長の成分を取り出して蛍光強度を測定する第二の受光測定手段と、これら第一の受光測定手段及び第二の受光測定手段で測定した測定値を入力として酵素活性を演算する演算手段とを備えたことを特徴とする酵素活性測定装置。

【請求項 8】 請求項 7 において、試料が充填されている上方開口型の容器に対して投光手段から励起光を照射する光路と、この容器内の試料から放射されて受光手段に入射される蛍光の光路とを、該容器の上方開口から入射するように重複して設けたことを特徴とする酵素活

性測定装置。

【請求項 9】 請求項 7 又は 8 において、演算手段が、第一の測定値を第二の測定値で除算する割算回路を有することを特徴とする酵素活性測定装置。

05 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、免疫反応等の測定用標識として用いられた酵素の活性を、その酵素の作用を受けた物質の蛍光強度を検出することを通じて測定する方法、及び装置に関するものである。

【0002】

【発明の背景と従来技術】従来より、例えば微量の生体物質を測定する方法として、酵素を標識として用いた酵素標識免疫測定方法や、酵素標識 DNA ハイブリダイゼーション法が知られている。

【0003】これらの方法は、免疫反応等により生じた免疫複合体等に直接的あるいは間接的に標識された酵素の活性を、基質の変化を検出することで、生体物質の存在や量の測定を行なうことを原理とした方法であり、例えば、酵素活性の作用を受けた試料の光吸収係数の変化を測定する方法、酵素活性の作用を受けた試料の蛍光強度の変化を測定する方法、酵素活性の作用を受けた試料の発光強度の変化を測定する方法等が知られている。そしてこれらのうち後二者の蛍光や発光を利用して酵素活性を測定する方法は、前者の光吸収による酵素活性を測定する方法に比べて高感度な測定が可能であり、しかも短時間で測定が可能という利点がある。なかでも蛍光を利用する方法は高感度な酵素活性測定法として知られている。

【0004】また、試料の蛍光強度等の変化から生体物質等を定量測定する場合の検出手法についてもいくつかの提案があり、例えば酵素反応が開始した後ある時間が経過した特定の時点で測定を行ない、その測定値から酵素活性を求める方法（一点法と称されている）、酵素反応が進む一連の過程中的前後の二つの時点で測定を行ないその測定値の差から酵素活性を求める方法（二点法と称されている）、酵素反応の進行に追従して略連続的に測定を行ないその連続した測定値の変化率から酵素活性を求める方法（レート法と称されている）などが知られている。

【0005】そして、近年においては特に臨床診断等の分野で微量物質の定量測定の意義、評価が次第に高まり、微量な生体物質を高精度、高感度に測定することが求められるようになってきており、このような要求に応じて、複数の試料間での汚染がないシステムや、検出感度が高くかつ多数検体の連続測定を行なうに適した検出器等も提案されつつある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】ところで、上述のような高感度、高精度な生体物質等の定量測定を目的として

提案され、あるいは既に実施に供されている従来の方法、装置においては、例えば、試料中に存在する気泡や液のメニスカス等の影響を無視できないために、測定精度を一定以上に向上させるのには限界があることが指摘されている。このようなものの影響によって限界を生ずる理由の一つは、代表的には、対象とする生体物質等の試料が一般に微量である点にある。微量である分上記影響を無視できない場合が多いからである。

【0007】例えば、気泡が存在すると気泡がない場合に比べて蛍光測定値が大きくなるため、測定中に気泡が消えると、例えばレート法では真の値よりも低いレート値を示す結果となる。ところが、標識酵素の反応を受ける基質を反応容器内に注入する場合、この基質分注は多数検体の迅速処理のために出来るだけ速やかに行なうことが望まれ、また分注量の精度を高める目的で分注終了時のノズル先端での液滴付着を避けることが求められるが、このためにノズルからの液吐出速度を大きくすると、分注液の泡立ちを招く傾向が大きくなる。また一般に酵素標識免疫測定においては、基質分注前に免疫反応複合体と未反応物を分離するいわゆるB/F分離の操作を行なうが、この際に使用する洗浄液に界面活性剤を含んでおり、その濃度を上げると気泡が発生し易くなる。

【0008】そこでこれらの問題を原理的に克服して、より精度を向上した測定を可能とする新たな提案が待たれている。

【0009】また上記の問題とは別に、蛍光測定の高感度化が求められている。例えばTSH（甲状腺刺激ホルモン）の免疫測定では、従来は検出下限界は $0.1 \mu\text{IU}/\text{ml}$ 程度であったが、最近、TSHが異常低値を示す病態を診断する必要から $0.01 \mu\text{IU}/\text{ml}$ の検出下限界が求められるようになり、このために標識酵素の非特異的反応の低減化と共に、検出の高感度化が求められているのである。そしてこのような検出感度の向上のためには、外乱等による測定値の変化と、実際の測定値の変化とが明らかに区別できなければならない。

【0010】本発明者はこのような観点から鋭意検討を重ね、酵素標識免疫測定法や酵素標識DNAハイブリダイゼーション法による測定において、測定精度向上に障害となっている問題、例えば試料中の気泡の存在による影響、メニスカスによる影響、試料の攪拌のために例えば反応容器内に磁性粒子を添加してこれを振動磁界により移動させるようなことに伴う影響、光源光の経時的な変化、等々の影響を低減でき、誤差が少なく、高精度、高感度な測定を実現できる方法、装置の提供を目的として本発明をなすに至った。

【0011】また本発明の他の目的は、光源と反応容器の位置関係が容器に投射される光量が多少変化してもそれが測定結果に影響せず、常に安定して高精度な測定を実現できる方法、装置の提供することにある。

【0012】更にまた本発明の別の目的は、酵素標識免

疫測定法や酵素標識DNAハイブリダイゼーション法による測定を実施する場合に、従来、測定誤差低減のために装置構成上の負担が大きくなっていた基質分注手段や試料攪拌手段等の構成を簡易化、自動化に有益で、しかも高精度な測定を維持できる新規な測定方法及び装置を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段及び作用】以上のような目的を実現するために、本発明者は、酵素と、この酵素の作用を受けて生成物を生ずる基質と、上記酵素の作用は受けないが蛍光を発する基準物質とを含んだ試料に、励起光を照射し、これによって該試料から放射される蛍光のうち、少なくとも上記生成物からの蛍光を含む波長の蛍光強度により第一の測定値を求めると共に、該第一の測定値を求めた波長とは異なりかつ少なくとも上記基準物質からの蛍光を含む波長の蛍光強度により第二の測定値を求め、これらの第一の測定値と第二の測定値の比に基づき上記酵素の活性を求めることを特徴とする本発明の酵素活性測定方法を完成した。

【0014】酵素活性を求めるには、例えば第一の波長領域で測定した第一の測定値を、上記第二の測定値で割った値の時間に対する変化率に基づき、例えば既知の試料を用いて予め作成しておいた検量線を用いて求めることができる。ここで蛍光強度の時間に対する変化率を、上述した二点法で求めたり、レート法として上述したように酵素反応の経過に追従して略連続的に測定を行ないその連続した測定値の変化率から酵素活性を求める方法が特に好ましい方法として推奨されるが、特にこれに限定されるものではない。

【0015】本発明方法の特徴は、次ぎのように説明される。いま上記基質、酵素作用を受けて生ずる生成物、及び基準物質のいずれもが蛍光物質であるとし、これらに励起光を照射した時に各々の物質から放射される蛍光を考えると、蛍光強度は蛍光物質の濃度と比例関係を有し、また泡等の外乱の影響は全体に表われるから、上記の所定の波長で測定される第一の測定値（FI1）と、これとは異なる波長で測定される上記第二の測定値（FI2）とは夫々下記式で表わされることになる。

【0016】 $(\text{FI1}) = p \times (k_1 \times [\text{基質}] + k_2 \times [\text{生成物}] + k_3 \times [\text{基準物質}])$
 $(\text{FI2}) = p \times (k_4 \times [\text{基質}] + k_5 \times [\text{生成物}] + k_6 \times [\text{基準物質}])$

（但し式中において、 p は泡等により試料全体に現われる蛍光の変動係数であり、 $[\]$ は夫々の物質の濃度、 $k_1 \sim k_6$ は夫々の物質のその波長領域に係わる比例係数を表し、 $k_1/k_4 = k_2/k_5 = k_3/k_6 \neq 0$ である。）

ここで、本発明方法によりこれらの比を求めると下記式（1）となり、更に基質濃度を生成物濃度で表わすように式を変形すれば、生成物濃度は下記式（2）により基

単物質濃度と比例係数 $k_1 \sim k_6$ から得ることができ
る。

$$\frac{FI1}{FI2} = \frac{k_1 \times [\text{基質}] + k_2 \times [\text{生成物}] + k_3 \times [\text{基準物質}]}{k_4 \times [\text{基質}] + k_5 \times [\text{生成物}] + k_6 \times [\text{基準物質}]} \quad \dots (1)$$

$$\begin{aligned} & (k_1 \times ([\text{基質}]_0 - [\text{生成物}]) + k_2 \times [\text{生成物}] + k_3 \times [\text{基準物質}]) \times FI2 \\ & = (k_4 \times ([\text{基質}]_0 - [\text{生成物}]) + k_5 \times [\text{生成物}] + k_6 \times [\text{基準物質}]) \times FI1 \end{aligned} \quad \dots (2)$$

(但し、 $[\text{基質}]_0$ は反応容器に添加する基質の初期濃度として既知である。)

【0018】この式(1)あるいは(2)を用いて二つの測定値の比を求めることにより、酵素活性を示す値から蛍光の変動の影響が除去されることが分かる。

【0019】なお上記の式は、試料中に存在する基質、生成物、基準物質の全てが励起光によって蛍光を発する場合として一般的に説明しているが、第一の測定値を得るための波長の選択や、第二の測定値を得るための波長の選択等により、 $k_1=0$ や、 $k_1=k_4=k_5=0$ とすることもでき(なお完全に0である場合の他、実質的に0と見なすことができる場合であってもよい)、一方の測定値(例えば第一の測定値)において生成物からの蛍光強度を検出することと、他方の測定値(例えば第二の測定値)から基準物質の蛍光強度を検出することとを必須とすることで、本発明方法の目的を達成できる。

【0020】本発明の方法における励起光の波長は、基質と生成物のうちの少なくともいずれか一方、及び基準物質の双方を同時に励起することができる波長領域を含むように選択される。

【0021】試料中から放射される蛍光のうちで第一の測定値を求めるために測定する蛍光波長(以下「第一の蛍光波長」という)は、上述の如く、基質あるいは生成物から放射される蛍光の波長領域を含む範囲から選択され、第二の測定値を求めるための蛍光波長(以下「第二の蛍光波長」という)は、基準物質から放射される蛍光波長領域を含む範囲から選択される。ここで波長とは、所定の波長領域を包含するものをいう。

【0022】励起光の波長と第一の蛍光波長は、基質が生成物に変化することで生ずる蛍光特性の変化が蛍光測定値に反映するように選択される。

【0023】酵素は、遊離の天然酵素等であってもよいし、あるいは遊離の抗原、抗体、DNAなどに結合された酵素でもよく、更に、酵素標識免疫測定法や酵素標識DNAハイブリダイゼーション法の結果、小容器の内壁あるいはシート表面等に間接的に結合された酵素であってもよい。

【0024】酵素標識免疫測定法や酵素標識DNAハイ

【0017】

【数1】

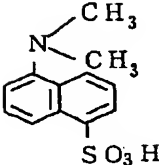

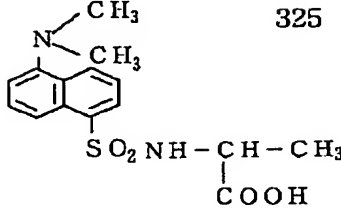
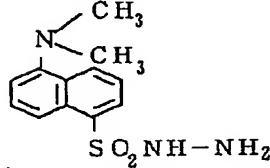
ブリダイゼーション法における標識酵素としてはアルカリ性フォスファターゼや β -ガラクトシダーゼ等を代表的に例示することができ、前者のアルカリ性フォスファターゼの作用で蛍光測定値が変化する基質としては、例えば4-メチルウンベリフェリルリン酸を例示できる。この基質は上記酵素の作用により4-メチルウンベリフェロンに変化(生成)する。また後者の β -ガラクトシダーゼの作用で蛍光測定値が変化する基質としては、例えば4-メチルウンベリフェリルガラクトシドを例示でき、この基質は上記酵素により4-メチルウンベリフェロンに変化(生成)する。そして例えば上記生成物(4-メチルウンベリフェロン)に対し、アルカリ性(pH 10)の下で365nmの波長を持つ励起光を照射(図4(b)参照)すると、4-メチルウンベリフェロンは450nm付近に極大をもつ蛍光(図4(a)参照)を発するが、4-メチルウンベリフェリルリン酸及び4-メチルウンベリフェリルガラクトシドからの蛍光は殆ど無視できる。したがって365nmの励起光を照射することで試料から放射される蛍光のうちから、450nm前後の波長の蛍光を取り出して生成物からの蛍光強度を測定することができる。

【0025】上記のような基質、生成物を含む試料に対し、本発明方法の特徴的構成として加えられる基準物質は、上記の励起光の照射を受けて、酵素の作用により変化する蛍光スペクトルの変化の形とは異なる蛍光スペクトルの形をもつ蛍光を放射する物質の中から選択される。

【0026】上記で代表的に例示した4-メチルウンベリフェロンの例でいえば、365nmの励起光の照射を受けて例えば500nm以上の波長の蛍光を放射する物質から該基準物質を選択することが好ましい。このような基準物質として用いることが出来る物質の例を以下の化1、化2に例示した。

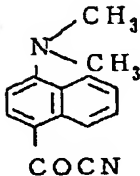
【0027】

【化1】

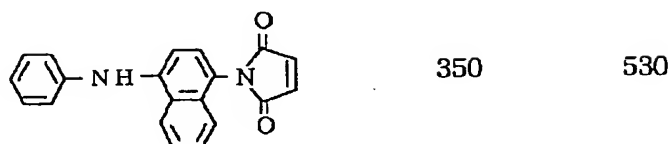
(構造式)	(E_x^{max}) nm	(E_m^{max}) nm
1) ダンシル化合物		
(例) ダンシルスルホン酸		
	325	550
ダンシルクロライド		
	325	550
ダンシルアミノ酸		
(例) ダンシル-L-アラニン		
	325	550
ダンシルヒドラジン		
	340	525

【0028】

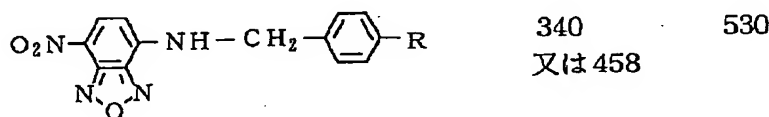
【化2】

(構造式)	(E_x^{\max}) nm	(E_m^{\max}) nm
2) 4-ジメチルアミノ-1-ナフトイルニトリル		
	350	530

3) N-(1-アニリノナフチル)-4-マレイミド



4) 7-ベンジルアミノ-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール(R=H)
 7-(p-メトキシベンジルアミノ)-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-
 ジアゾール(R=OCH₃)



【0029】これらの物質の励起スペクトルの極大は365nmにないが、例えば上記表中に例示されたダンシル-L-アラニンは、図5(a)に示すように励起スペクトルに幅をもっているので、365nmの励起光を照射することで約550nmに極大をもつ蛍光の放射が得られる(図5(b)参照)。

【0030】なお酵素反応の生成物として4-メチルウンベリフェロンを用いダンシル-L-アラニンを基準物質として用いた場合には、両者の蛍光スペクトルが多少重なる(図4(b)及び図5(b)参照)。このため、第一の蛍光波長として450nm前後の波長の光を取り出すと、その中に基準物質からの蛍光もわずかに含まれることになるが、本発明の特徴である第一の蛍光波長で測定した第一の測定値と上記500nm以上の波長で測定した第二の測定値の比を求めても、その値は時間に対する変化率には影響しない。

【0031】また上述の場合、第二の蛍光波長で測定した第二の測定値に4-メチルウンベリフェロンからの蛍

光も含まれるが、4-メチルウンベリフェロンの影響が大きくなるように第二の蛍光波長と基準物質の濃度を選ぶことで本発明の効果を適切に発揮させることができる。具体的には例えば、上述の例の実施に当たり試料中に共存させるべき基準物質の濃度を、第二の蛍光波長における蛍光強度が十分に強く、しかも基準物質による励起光の吸収が過大にならない範囲とすること、一般的には吸収率が50%以下とすることがよい。また基質あるいは生成物の蛍光スペクトルの波長と基準物質の励起スペクトルの波長が重なる場合には、基質あるいは生成物から放射された蛍光が基準物質により再吸収されるので、基準物質の濃度は該再吸収の割合が過大とならない範囲、一般的には再吸収の割合が50%以下とすることがよい。

【0032】本発明方法の測定対象とできる試料は、上記酵素標識免疫測定法や酵素標識DNAハイブリダイゼーション法を適用できるものであれば特に限定されることはなく、一般的には小さなカップ状の小容器に入れて

測定装置に供給される場合が多い。

【0033】また本発明の酵素活性測定装置の特徴は、酵素の作用に由来して増加あるいは減少する蛍光物質及び酵素の作用を受けないが蛍光を発する基準物質を含む試料に対して励起光を照射する投光手段と、試料が放射する蛍光のなかから上記蛍光物質に由来した第一の測定値を求める波長の成分を取り出して蛍光強度を測定する第一の受光測定手段と、試料が放射する蛍光のなかから上記基準物質に由来した第二の測定値を求める波長の成分を取り出して蛍光強度を測定する第二の受光測定手段と、これら第一の受光測定手段及び第二の受光測定手段で測定した測定値を入力として酵素活性を演算する演算手段とを備えたという構成をなすところにある。

【0034】上記において、励起光を照射する投光手段は、一般的には光源、レンズ、フィルター、ミラー、集光レンズ等を適宜組み合わせた光学系として構成される。光源は好ましくは点滅点灯する方式のものがよい。受光側での同期検波により、受光センサから得られる信号から外乱光等の影響を除去して、試料に起因する蛍光成分のみを取り出して、より信頼性の高い蛍光強度の検出が可能になるからである。光源点滅のためには、例えば機械式のチョップでもよいが、放電管あるいは蛍光管を用いて数10Hz～数100Hzの範囲で点滅させる光源ランプは長時間連続運転での耐久性に優れた光源として有利である。電源には上記周波数の交流やパルス電源や、上記周波数で断続される数kHz～数十kHzの高周波交流電源を用いることもできる。

【0035】本発明における酵素活性測定装置の受光測定手段は、第一及び第二の受光測定手段として構成され、夫々、ミラー、集光レンズ、フィルター、フォトダイオードや光電子増倍管等の受光センサなどの受光光学系と、増幅器などの電気回路要素を組み合わせる構成される。なお上述したように光源光の点滅点灯手段が組み合わせられる場合には、例えば蛍光管等を点滅させるためのクロック信号を用いて受光センサからの電気信号を同期検波する検波器も併せて用いられる。

【0036】本発明における酵素活性測定装置は、試料に対して励起光を照射する向きと逆向きに試料から放射された蛍光を検出する方式や、励起光の照射と蛍光の取り出しを直角方向にする方式のいずれであっても良いが、多数の試料を対象として連続的な能率の良い酵素活性測定を行なうためには、投光系の光路と受光系の光路を重複させたトプートップ方式による構成のものが好ましく採用される。例えば投光系の光路中にダイクロイックミラー等を配置して光源光を反射させて下向きに照射し、かつ受光系の光路中に配置したフィルター、ハーフミラーあるいはダイクロイックミラー等により、試料から上向きに放射された蛍光を第一の蛍光波長の成分を含む光と、第二の蛍光波長の成分を含む光に分け、それぞれ別々の受光センサで検出するようにした構成のもの

を例示できる。特にダイクロイックミラーを用いることは、特性を励起光の波長と蛍光波長に合わせて選択することによって励起光と蛍光のロスを減らし有効に利用できる点で有利である。

05 【0037】光源光、受光センサ、フィルターなどの位置等は、例えばダイクロイックミラー等の採用する構成要素の特性に合わせて選択される。

【0038】図6の(a)～(c)は夫々、上述したトプートップ方式を採用した例の測定装置の光学系の構成概要を示したものであり、光源光501からの光をハーフミラー又はダイクロイックミラー507、508を介して試料容器2内の試料1に照射し、これによって放射された蛍光をフィルター505、506を通して受光センサ503、504に受光させるようにしている。なお図6(b)、(c)中の符号は、図6(a)と同じ構成要素にそれぞれ10、20を加えて付している。

【0039】本発明の演算装置において行なう割算処理は、第一の受光系で得られた電気信号と第二の受光系で得られた電気信号とを、アナログ的に処理してもよいし、上記各信号をA/D変換してデジタル信号に変換した後に、デジタルコンピュータなどのデジタル演算回路で処理するようにしてもよい。

【0040】図7は以上のような構成をもつ測定装置の信号処理系を模式的に示したものであり、図7(a)は直流電源80により連続点灯される光源70を用いた例であり、図7(b)はパルス電源81により点滅点灯される光源70を用いた例を示している。受光センサ63、64に入力された光は、電気信号71、72としてアンプ73、74で増幅され、A/D変換器75、76でデジタル信号に変換された後、コンピュータなどのデジタル演算回路77により、例えば時間に対する変化率の計算と割り算処理が行なわれる。

【0041】図7(b)の82はクロック発生回路であり、パルス電源81と受光系の同期検波回路83、84を同期させるように用いられる。

【0042】なお上記電気信号71、72をアナログ割り算回路に入力し、その出力をA/D変換器によってデジタル信号に変換し、その後、コンピュータなどのデジタル演算回路により、上述した時間に対する変化率の計算等を行なってもよいことは当然である。

40 【0043】

【実施例】以下本発明を図面に示す実施例に基づいて更に詳細に説明する。

【0044】実施例1

45 図3は、本発明方法の測定に用いる装置(トプートップ方式光学系を有する構成)の一例を示したものであり、この図において、2は数 μ l程度の少量の試料液1が充填されているカップ状の試料容器(上端口径10mm、容積1ml)であり、図示しない基質充填-酵素反応の工程を経て蛍光検出のための測定位置に移入され

る。この図3は測定位置に該試料容器1が移入された状態を図示している。なお本例における基質から変化した生成物は、4-メチルウンベリフェリルリン酸のアルカリ性フォスファターゼによる生成物であって、図4

(a)、(b)の蛍光特性を有する4-メチルウンベリフェロンであり、また基準物質としては図5(a)、(b)で示した蛍光特性を有するダンシル-L-アラニンを用いた。

【0045】61は励起光の投光光学系の光源を示し、光源光は、320nm~380nmの光を透過するフィルター62を通して、ハーフミラー67により反射されて、試料容器2中の試料1に向けて励起光として下向きに照射されるようになっている。

【0046】この励起光の照射により試料液1から放射された蛍光は、上向きにハーフミラー67を通過し、ダイクロイックミラー68で第一の蛍光波長を含む光と第二の蛍光波長を含む光に分けられる。このダイクロイックミラー68は、530nm以上の光は透過するが、420nm~530nmの光は反射する特性をもつように設けられている。

【0047】上記ダイクロイックミラー68で分けられた第一の蛍光波長の光は、450nm~510nmの光を透過するフィルター65を通して波長を選択されて受光センサ63に受光され、他方第二の蛍光波長の光は、そのまま上向きに進み600nm以上の光を透過するフィルター66を通して波長を選択されて受光センサ64に受光される。

【0048】以上の構成をなす測定装置を用いて、アルカリ性フォスファターゼで標識された生体物質、基質(4-メチルウンベリフェリルリン酸)と基準物質(ダンシル-L-アラニン)を混在させた試料液の蛍光を測定した。なおアルカリ性フォスファターゼは任意量、4-メチルウンベリフェリルリン酸の濃度は1mM、ダンシル-L-アラニンの濃度は100μg/mlである。

【0049】これにより検出された第一の蛍光波長の測定値Aと第二の蛍光波長Bの測定値の時間依存性を図1に示した。また、第一の蛍光波長で測定した第一の測定

$$(\text{Sig}(4\text{MU}) - \text{Sig}(4\text{MU}_0)) / (\text{ref}(\text{DLA}) - \text{ref}(\text{DLA}_0)) \quad \dots (3)$$

(但し、式中においてSig(4MU)は、第一の波長によって測定された蛍光強度の測定値(実質的に4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度)であり、Sig(4MU₀)は空カップでの測定値である。また、ref(DLA)は第二の波長によって測定された蛍光強度の測定値(実質的に基準物質の蛍光強度の測定値)であり、ref(DLA₀)は空カップでの測定値である。)

また、アルカリ性フォスファターゼを添加しない他は上記と同様にして試験を行ない、同様にして蛍光強度の測定及びレート算出を行なって(試験例No11~19)、その結果を下記第2表に示した。また試験を行なったうち(No13, 15)については、検出操作を行

値を第二の蛍光波長で測定した第二の測定値で割った値(相対蛍光強度)の時間依存性を図2に示した。図1及び図2中の■~■で示した位置は、人為的に試料液に空気を吹き込むことで形成された泡が破壊又は移動したため、測定される蛍光の強度が変化した位置を示している。

【0050】ここで図の対比から分かるように、空気を吹き込むと蛍光強度が大きく変化するが、図2で示した第一の蛍光測定値を第二の蛍光測定値で割った値は、気泡の影響を受けることがなく、したがって本発明方法により測定した測定値は、試料中に気泡が存在してもその影響を受けることなく、蛍光物質の蛍光強度の変化を正確に検出できる効果が確認された。

【0051】実施例2

15 本発明方法により得られた測定の結果を従来方法と比較するために次の試験を行なった。

【0052】上記実施例1と同様の構成を有する装置A I A 1200(株)東ソー社製)を用いて以下の試験を行なった。すなわち、本例では攪拌用の磁性体粒子(直径約1.5mm)の数個を填加した上記試料容器に、アルカリ性フォスファターゼ50μlをピペッターにより手分注し、これに、4-メチルウンベリフェリルリン酸溶液(4-メチルウンベリフェリルリン酸26mgを、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノールを4.5g含有する水溶液100mlに溶解して調整したもの)に予めダンシル-L-アラニンを0.1mg/ml(基質溶液100mlに対して5mg)添加した溶液をピペッターにより手分注で200μl分注し、これを直ちに検出器下に移動させて、直後から2秒間隔で100秒間、第一及び第二の波長で蛍光強度の測定を行ない、以下の算出式(3)を用いて最小二乗法によりレートを求めて(試験例No1~10)、その結果を下記第1表に示した。なお測定中は磁性体粒子を振動磁界により往復運動させた。また試験を行なったうち(No1, 9)については、検出操作を行う直前に容器内の液に空気を吹き込んだ。

【0053】

う直前に容器内の液に空気を吹き込んだ。なお本実験では、市販の免疫反应用試薬(Eテスト「TOSOH」、東ソー株式会社製)から取得した攪拌用ビーズを使用した。ビーズは、使用に先立って十分に洗浄したが、ごく僅かなアルカリ性フォスファターゼがその表面に非特異的に結合しているものと考えられた。

45 【0054】更にまた、比較のために、上記アルカリ性フォスファターゼを添加した場合と添加しなかった場合の夫々につき、上記第一の波長で検出した蛍光強度の測定値のみから、従来の算出法に従った下記の式(4)を用いて最小二乗法によりレートを求め(No1~10及びNo11~19)、その結果を下記第1表、第2表に

併記した。

【0055】

$$((\text{Sig}(4\text{MU}) - \text{Sig}(4\text{MU}_0)) / \text{ref}(\text{UV})) \times 50$$

… (4)

(但し、式中においてSig(4MU)、Sig(4MU₀)は上記の式

測定値との比較を容易化するために便宜的に掛けた係数である。)

(3)と同様である。なお(/ ref(UV))の項は、光源

【0056】

光の経時的な変動を除去するために測定値を光源光の強

度で除算する項であり、(×50)の項は、本発明方法の

【表1】

第1表

No	Rold (/sec)	Rnew (/sec)
1	0.232	0.256
2	0.267	0.257
3	0.276	0.259
4	0.277	0.256
5	0.280	0.256
6	0.270	0.248
7	0.236	0.224
8	0.291	0.250
9	0.267	0.253
10	0.285	0.252
平均	0.268	0.251
CV	6.9%	3.8%

但し、表中において

Rold : 従来方法による測定値

Rnew : 本発明方法による測定値

CV : 変動係数

を示している。

【0057】

35 【表2】

第 2 表

No	Rold (／sec)	Rnew (／sec)
11	0.120×10^{-3}	0.157×10^{-3}
12	0.098×10^{-3}	0.082×10^{-3}
13	0.733×10^{-3}	0.315×10^{-3}
14	0.099×10^{-3}	0.129×10^{-3}
15	-1.05×10^{-3}	0.023×10^{-3}
16	-0.112×10^{-3}	0.119×10^{-3}
17	0.131×10^{-3}	0.134×10^{-3}
18	0.175×10^{-3}	0.026×10^{-3}
19	-0.289×10^{-3}	0.038×10^{-3}
平均	-0.0105×10^{-3}	0.144×10^{-3}
SD	0.0449×10^{-3}	0.0998×10^{-3}

但し、表中において

Rold : 従来方法による測定値

Rnew : 本発明方法による測定値

SD : 標準偏差

を示している。

【0058】この第1表の結果から、従来法に比べ本発明方法による場合において、変動係数(CV値)が小さく、高精度な測定結果の得られることが確認でき、また第2表の結果から、本発明方法では従来法に比べて標準偏差(SD値)が大幅に小さいことが確認された。

【0059】また、測定中に空気を検出操作を行う直前に場合の測定値の変動を明かとするために、上記アルカリ性フォスファターゼを添加した場合の本発明方法の算出結果を図8の(A)、(B)に、従来法の算出結果を同図8の(a)、(b)で示し、アルカリ性フォスファターゼを添加しなかった場合の本発明方法の算出結果を図8の(C)、(D)に、従来法の算出結果を同図8のc、dで示した。

【0060】これらの図から、従来法の算出結果(a～d)では空気を吹き込んだ時点で大きな乱れが生じているが、本発明方法の算出結果(A～D)ではこのような乱れの生じていないことが分かる。

【0061】

【発明の効果】以上述べたように、本発明よりなる酵素活性測定方法及びその装置は、酵素標識免疫測定法や酵素標識DNAハイブリダイゼーション法等において高精度の酵素活性の測定が要求される場合に、試料中の気泡やメニスカスの影響による誤差が極めて少なく高精度な

測定が行なえるという効果がある。

【0062】また酵素標識免疫測定法や酵素標識DNAハイブリダイゼーション法による測定を機械化した装置で実施する場合の測定誤差を小さくするため、従来装置構成上の負担が大きかった基質の分注手段、酵素反応中の攪拌手段等を、高精度な測定を維持しつつ簡易に構成できるという効果もある。

【0063】また従来のこの種の測定装置においては、例えば励起光を発するランプの発光強度が経時的に劣化するという問題を考慮して該ランプの発光強度を検出するセンサを利用し測定蛍光値を補正(例えば測定検出した蛍光値を発光強度で割算する補正)を行なっている例はあるが、この方式では、ランプ発光強度の経時的な変化を補正することはできても、測定対象の試料容器とランプの位置がずれているために該容器に入る光束が変動することには対処できないのに対し、本発明方法の方式では、上記式(1)からも分かるように、同一時点で測定した二つの蛍光強度の比が、測定結果となるため、光源光の強さは直接測定結果に影響せず、測定精度の飛躍的な向上が得られるという効果がある。

【0064】更に上記のように種々の外乱の影響が除去されるため、高感度な測定が実現できる効果もある。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例において測定された第一の蛍光波長での第一の測定値と第二の蛍光波長での第二の測定値の時間依存性を示した図である。

【図2】第一の測定値を第二の測定値で割った相対蛍光強度の時間依存性を示した図である。

【図3】本発明の実施例の蛍光検出器の構成概要の一例を示した図である。

【図4】4-メチルウンベリフェリリン酸のアルカリ性フォスファターゼによる生成物である4-メチルウンベリフェロンの励起スペクトルと蛍光スペクトルを示した図である。

【図5】基準物質であるダンシルアラニンの励起スペクトルと蛍光スペクトルを示した図である。

【図6】(a)～(c)は夫々、本発明の酵素標識免疫測定装置を構成する測定光学系の構成概要を説明するための図である。

【図7】(a), (b)は夫々、本発明の測定法における信号処理を示した図である。

【図8】(a), (b)はアルカリ性フォスファターゼを添加した試料液の蛍光強度の変化を従来法により算出した結果を示した図であり、(A), (B)は同蛍光強度の変化を本発明方法により算出した結果を示した図である。

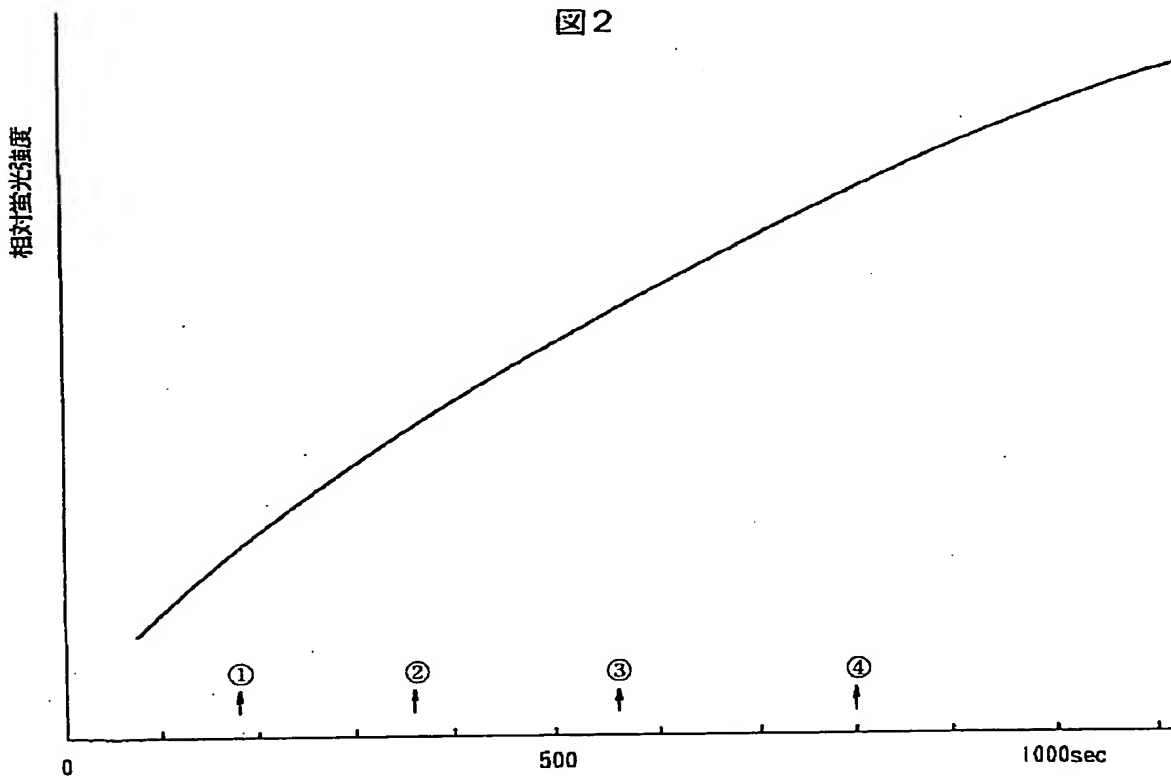
【図9】(c), (d)はアルカリ性フォスファターゼを実質的に添加しなかった試料液の蛍光強度の変化を従来法により算出した結果を示した図であり、(C), (D)は同蛍光強度の変化を本発明方法により算出した結果を示した図である。

【符号の説明】

61・・・光源、62, 65, 66・・・フィルター、63, 64・・・受光素子、67・・・ハーフミラー、68・・・ダイクロイックミラー。

【図2】

図2



【図1】

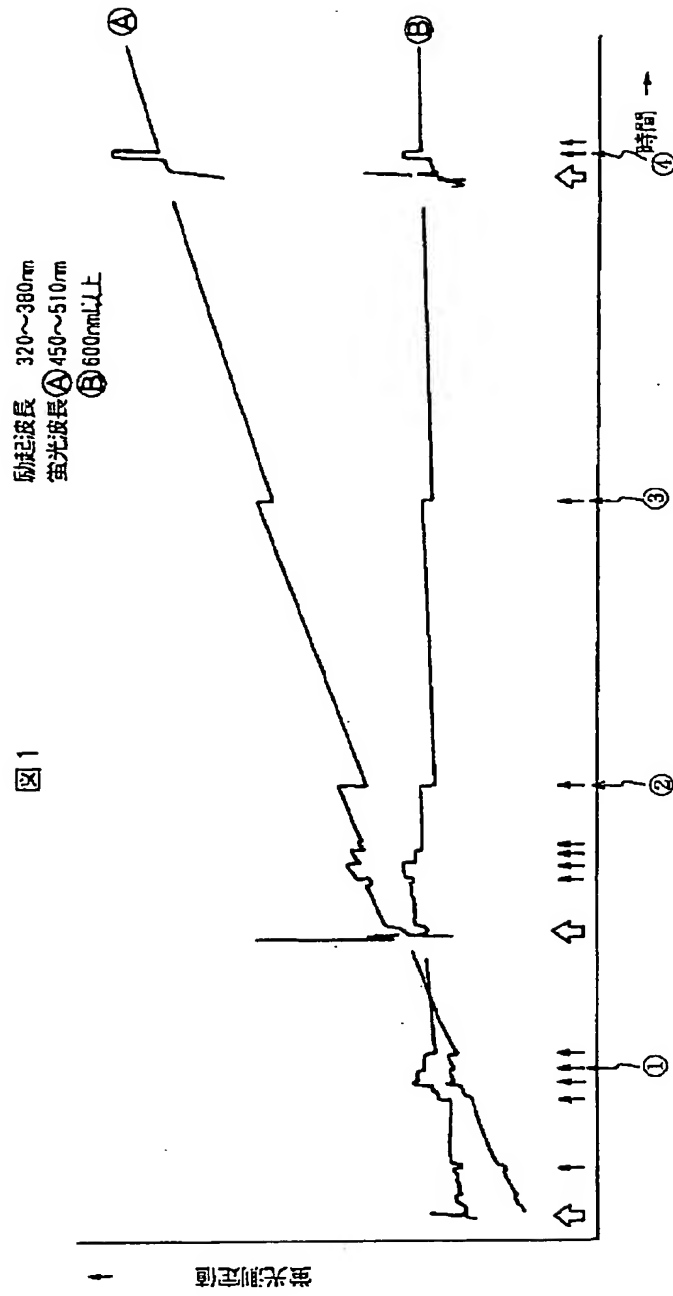
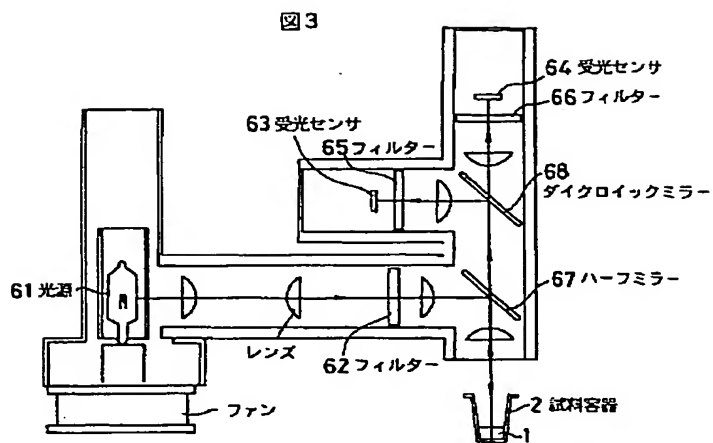


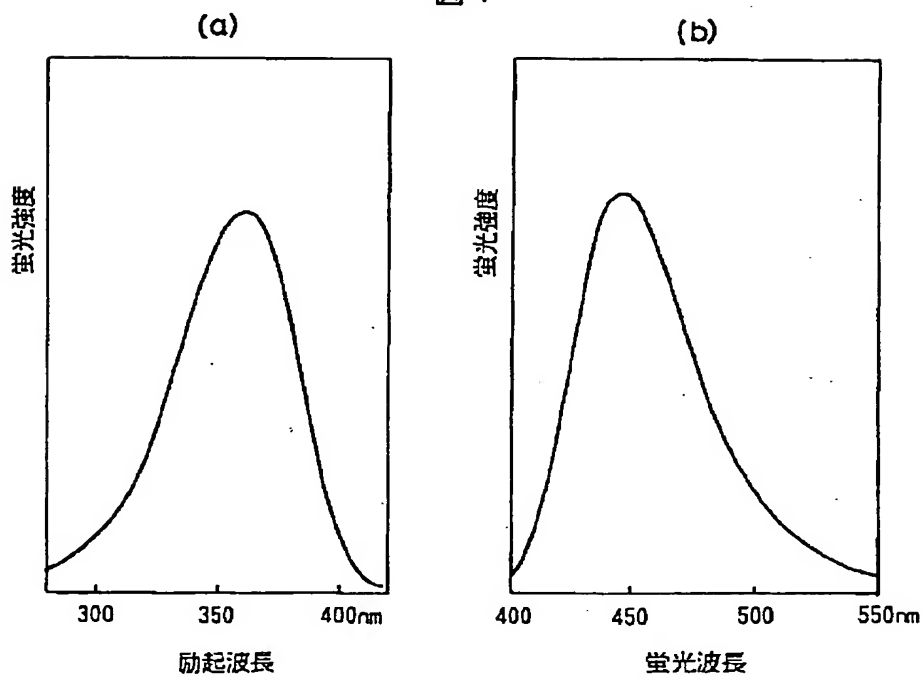
図1

【図 3】



【図 4】

図 4

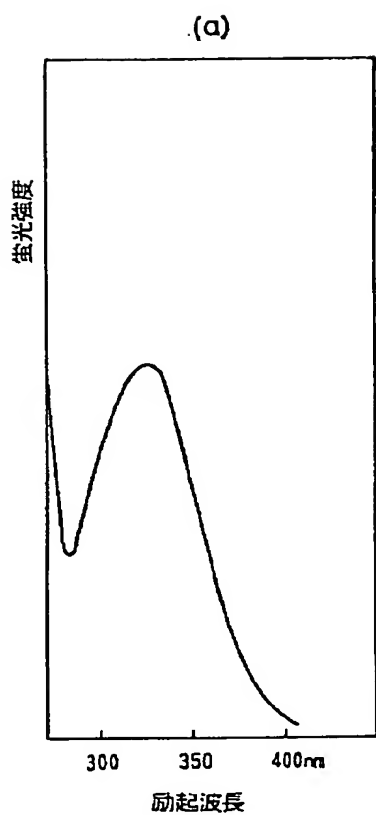


励起スペクトル
4-メチルウンベリフェロン
pH10
蛍光波長 450nm

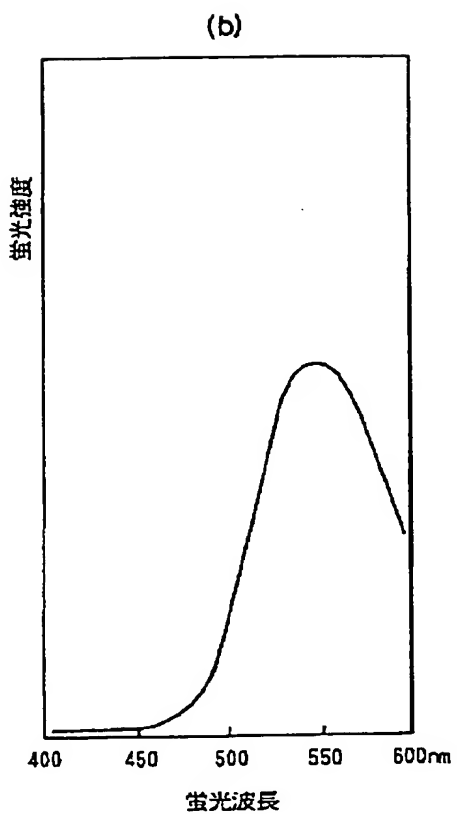
蛍光スペクトル
4-メチルウンベリフェロン
pH10
励起波長 365nm

【図5】

図5

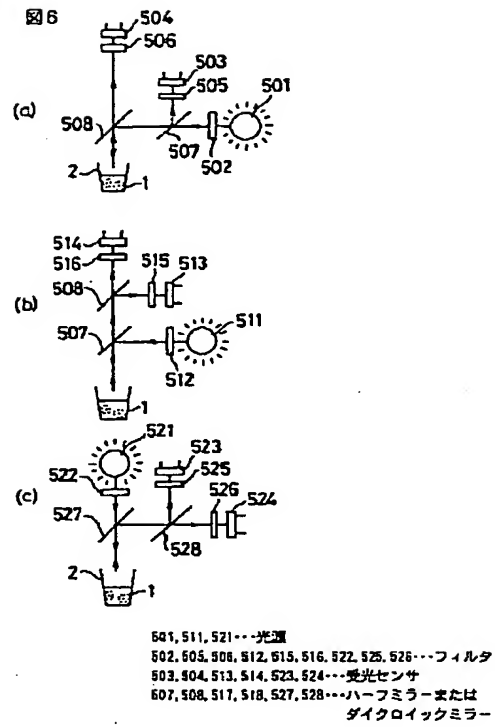


励起スペクトル
 ダンシルアラニン 10 μ g
 蛍光波長 550nm



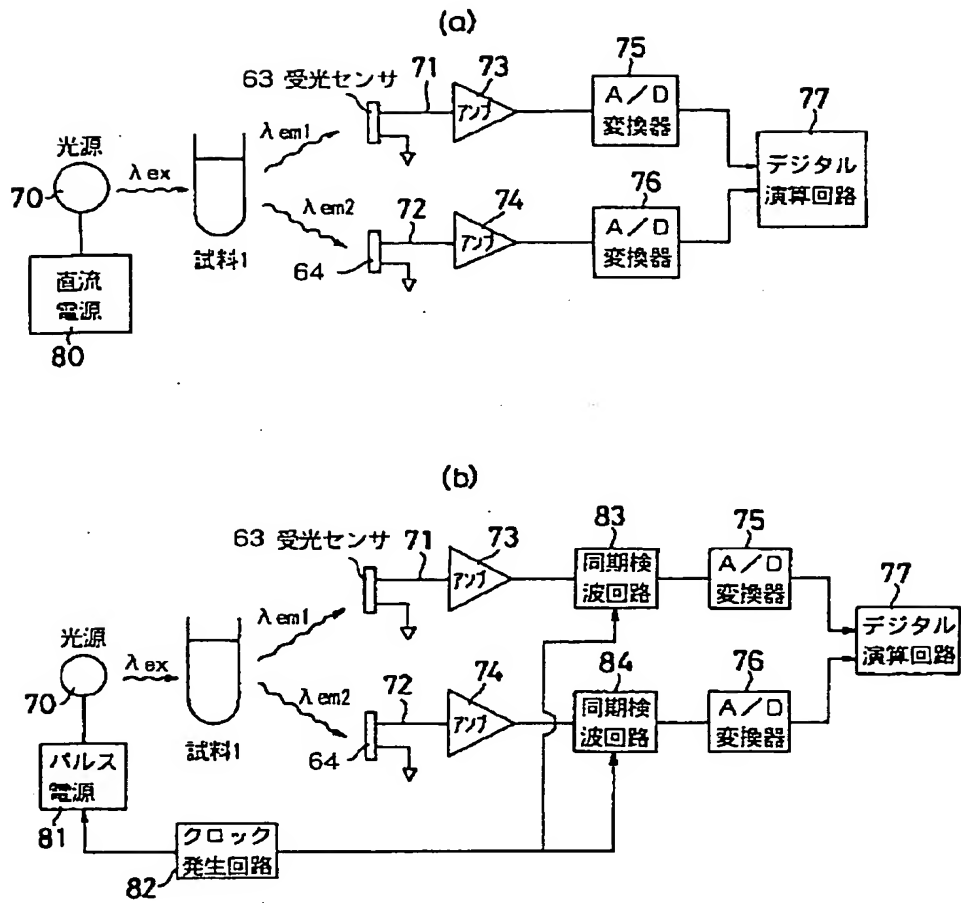
蛍光スペクトル
 ダンシルアラニン 10 μ g
 励起波長 325nm

【図6】

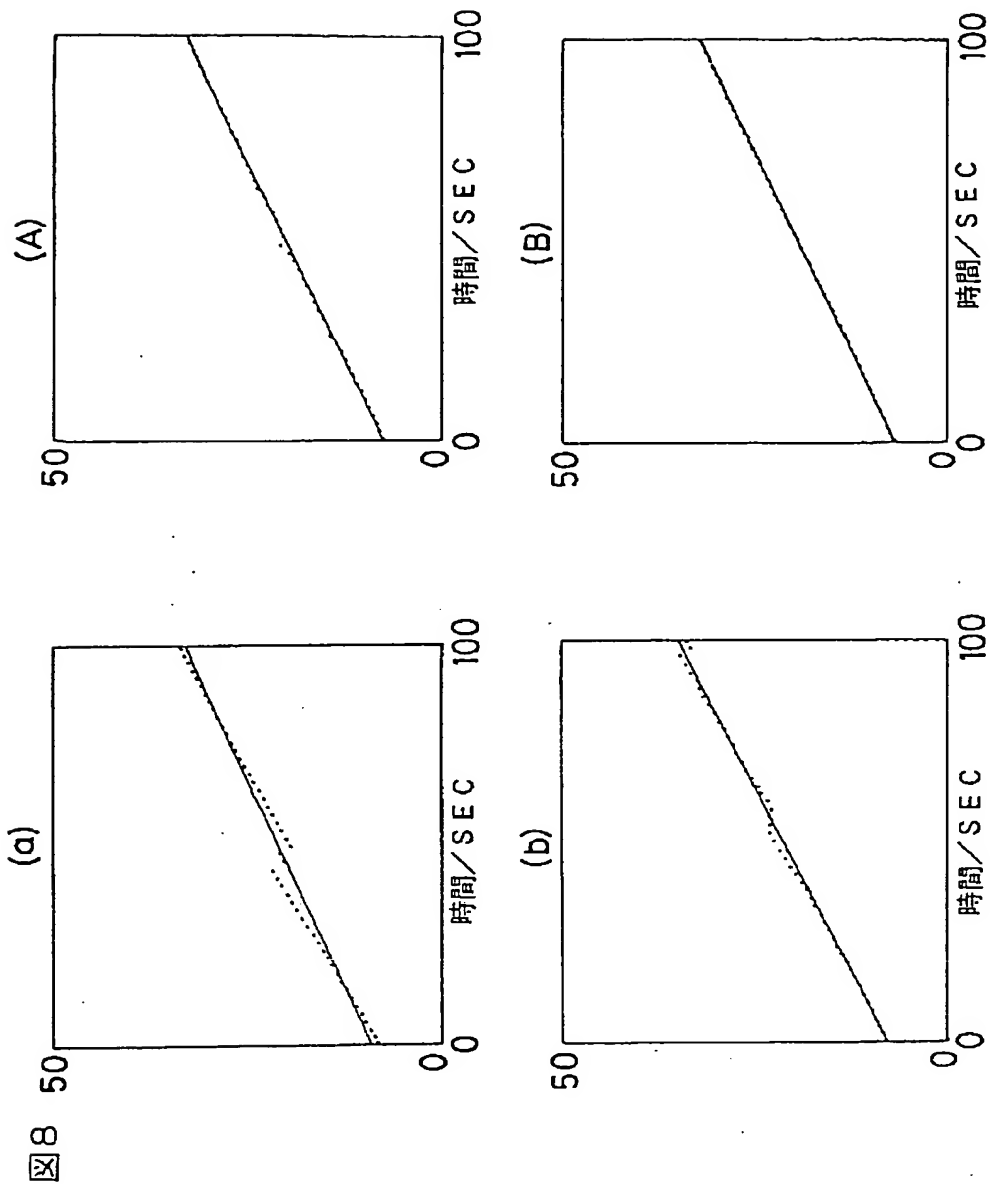


【図 7】

図 7



【図8】



【図 9】

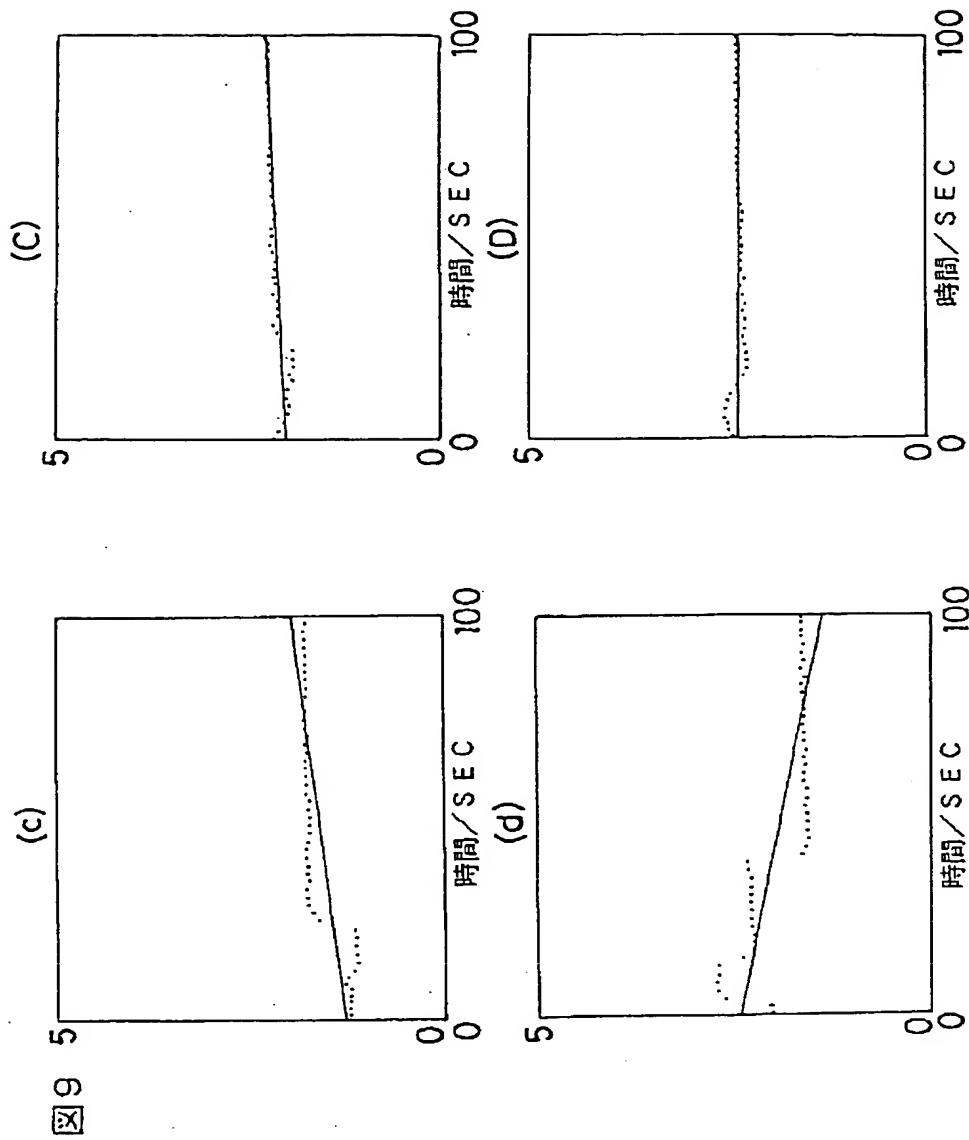


図 9

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵

G 0 1 N 33/535

33/543

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

8310-2 J

C 7906-2 J